

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 37 451.5
Anmeldetag: 14. August 2003
Anmelder/Inhaber: Cognis Deutschland GmbH & Co KG,
40589 Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Verwendung von PIT-Emulsionen in
enzymatischen Reaktionen
IPC: C 12 P, A 61 K

Best Available Copy

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stanschus

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

5 **Verwendung von PIT-Emulsionen in enzymatischen Reaktionen**

Gebiet der Erfindung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Emulsionen, die nach dem PIT-Verfahren hergestellt werden, als Reaktionsmedium für enzymatisch katalysierte Reaktionen.

15

Stand der Technik

20

In der chemischen und biochemischen Synthese werden vermehrt Enzyme als Katalysatoren eingesetzt. So werden in vielen Fällen aufgrund der oft milderen Reaktionsbedingungen bereits in großtechnischen Verfahren Hydrolasen, speziell Lipasen (EC 3.1.1.3) zur Fettspaltung eingesetzt.

Geeignete enzymatische Verfahren zur Veresterung oder Umesterung sind beispielsweise beschrieben in K. Drauz und H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH-Verlag, Weinheim 1975.

30

Bekannt ist, dass Transesterifikation in wasserfreien oder wasserarmen Medien durch Lipasen katalysiert werden. Ist im Reaktionssystem von Estern, Alkohol und Lipasen auch Wasser vorhanden, so setzt normalerweise eine Abspaltung von gebundenen Säuren zu freien Säuren ein. Da verschiedene Lipasen auch die Bildung von Estern aus freien Fettsäuren und Alkoholen katalysieren, werden im Endeffekt in den überwiegenden Fällen eine Transesterifikationsreaktion mit einer Säurezwischenstufe neben einer direkten Transesterifikation durchgeführt. Für viele technische Prozesse ist allerdings von großem Nachteil, dass freie Säuren im System gebildet werden. Teilweise verhindert der Wassergehalt eine technisch und kommerziell akzeptable Umsetzung (Ausbildung eines unvorteilhaften thermodynamischen Gleichgewichts). Aufwendige technische Anlagen (Wasserentfernung über z.B. azeotrope Destillation, Membrantrennverfahren, Vakuumdestillation) müssen zur Erzielung befriedigender Ausbeuten eingesetzt werden.

35

Der Nachteil bei enzymatisch katalysierten Reaktionen liegt oft in der Verfügbarkeit und Stabilität der am Prozess beteiligten funktionellen Proteine. Aus dem Stand der Technik sind bereits Enzyme bekannt, die durch Immobilisierung beispielsweise durch Mikroinkapselung stabilisiert vorliegen und mehrfach Verwendung finden können.

- 5 Die Umsetzung von hydrophoben Verbindungen kann bereits durch den Einsatz von Wasser in Öl (W/O) Mikroemulsionen durchgeführt werden, wie es von Orlich und Schomaeker in *Enzyme Microb. Technol.*; 2001; 28; 1; 42-48 für die Lipase aus *Candida rugosa* beschrieben wird. Sehr kritisch für die erfolgreiche Umsetzung ist jedoch die Konzentration an Wasser in der Lösung sowie die Zusammensetzung der Komponenten der W/O-Mikroemulsion.

10

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat somit darin bestanden, ein System für enzymatisch katalysierte Reaktionen zur Verfügung zu stellen, bei dem die Substratkonzentrationen variiert werden können wobei jedoch die Grenzflächen und damit die Konzentrationen an Öl und Wasser soweit konstant bleiben, dass sie keinen großen Einfluss auf die Reaktion und auf
15 die Aktivität des Enzyms haben. Des weiteren sollten diese Systeme kostengünstig und recyclingfähig sein.

Beschreibung der Erfindung

- 20 Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von O/W-Emulsionen als Reaktionsmedium für enzymatisch katalysierte Reaktionen, enthaltend mindesten Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase, wobei die Emulsion nach dem PIT-Verfahren hergestellt wird und eine Tröpfchengröße von 50 bis 400 nm aufweist.

- 25 Überraschenderweise wurde gefunden, dass O/W-Emulsionen die nach dem PIT-Verfahren hergestellt wurden, die eingangs geschilderten Anforderungen in ausgezeichneter Weise erfüllen.

PIT-Emulsionen

- Emulsionen sind disperse Zubereitungen aus mindestens zwei nicht ineinander löslichen Flüssigkeiten von denen eine wässrig ist. Zur Homogenisierung nicht mischbarer Öl/Wasser-Phasen durch Emulgierung werden Emulgatoren beziehungsweise Emulgatorsysteme eingesetzt. Ohne Einfluss von stabilisierenden Emulgatoren würden sich die Phasen aufgrund ihrer
35 unterschiedlichen Polaritäten wieder trennen. Die amphiphilen Emulgatoren sitzen an den Grenzflächen zwischen den fein verteilten Tröpfchen und der kohärenten Phase und verhindern durch sterische oder elektrostatische Abschirmung ihr Zusammenfließen (= Koaleszenz).

Emulgatoren sind Verbindungen, die in ihrer Molekülstruktur hydrophile und lipophile Bausteine miteinander verbinden. Auswahl und Ausmaß der jeweiligen Bausteine im betroffenen Emulgatormolekül beziehungsweise Emulgatorsystem werden häufig durch den HLB-

5 Dabei gilt üblicherweise: Emulgatoren beziehungsweise Emulgatorsysteme mit vergleichsweise stark hydrophilen Anteilen führen zu hohen HLB-Werten und in ihrer praktischen Anwendung in der Regel zu den Wasser-basierten O/W-Emulsionen mit disperser Ölphase. Emulgatoren beziehungsweise Emulgatorsysteme mit vergleichsweise stark lipophilen Anteilen führen zu vergleichsweise niedrigeren HLB-Werten und damit zur W/O-Invertemulsion mit geschlossener Ölphase und disperser Wasserphase.

15 Es ist bekannt, daß Öl-in-Wasser-Emulsionen (O/W), die mit nichtionogenen Emulgatoren hergestellt und stabilisiert sind, bei Erwärmen eine in der Regel reversible Phaseninversion erfahren können, d.h., dass innerhalb eines bestimmten Temperaturintervalls ein Wechsel des Emulsionstyps von O/W zu W/O (Wasser-in-Öl-Emulsion) erfolgt. Da dabei das Öl zur äußeren, kontinuierlichen Phase wird, sinkt die Leitfähigkeit der Emulsion auf Null. Der Mittelwert der Temperaturen zwischen maximaler und gerade auf Null gefallener Leitfähigkeit der Emulsion bei Temperaturerhöhung wird Phaseninversionstemperatur (PIT) und die auf diese Weise hergestellten Emulsionen werden PIT-Emulsionen genannt.

20 Es ist auch bekannt, dass die Lage der PIT von vielen Faktoren abhängig ist, zum Beispiel von der Art und des Phasenvolumens der Ölkomponente, von der Hydrophilie und der Struktur der Emulgatoren und der Zusammensetzung des Emulgatorsystems.

25 Wesentlich für die Feinteiligkeit der PIT-Emulsion ist deren Herstellungsverfahren. In der Regel werden die Wasser- und Ölphase mit den Emulgatoren vermischt und danach auf eine Temperatur oberhalb der PIT erwärmt. Die Leitfähigkeit muß dabei auf Null fallen. Anschließend wird die Emulsion wieder auf die Ausgangstemperatur abgekühlt (in der Regel Raumtemperatur, ca. 20°C). Dabei erfolgt erst durch Überschreiten und das anschließende Unterschreiten der PIT die Ausbildung der erfindungsgemäß verwendeten Emulsion.

30 Es ist bekannt, dass nur solche PIT-Emulsionen besonders feinteilig sind, welche bei der Phaseninversion eine Mikroemulsionsphase mit niedriger Grenzflächenspannung zwischen Öl und Wasser oder eine lamellare flüssigkristalline Phase ausbilden. Der entscheidende Schritt ist dabei immer die Rückinvertierung bei Abkühlung.

35 Die erfindungsgemäßen Emulsionen zeichnen sich insbesondere durch ihre Feinteiligkeit aus. Die Tröpfchengröße beträgt 50 bis 400 nm. Vorzugsweise liegt die Tröpfchengröße im Bereich von 70 bis 300 nm, insbesondere im Bereich von 80 bis 250 nm und besonders bevorzugt im Bereich von 90 bis 160 nm. Bei den Tröpfchengrößen wird eine Verteilung nach

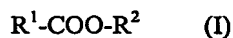
Gauss angenommen. Die Messung erfolgt beispielsweise durch Lichtstreuung oder Absorption.

Diese feinverteilten Emulsionen behalten ihre Homogenität durch die Brownsche Molekularbewegung. Diese Brownsche Molekularbewegung ist eine thermische Zufallsbewegung von Teilchen $< 5 \mu\text{m}$. Sie ist die treibende Kraft der Diffusion und behindert sowohl die Sedimentation als auch das Aufrahmen (Flotation). Ein großer Vorteil besteht darin, dass energieaufwendige Rührvorgänge vermindert werden können. Sie führt zu einer verbesserten Diffusion von Substrat und Enzym und zu verminderten Energiekosten.

Die Substratkonzentrationen können variiert werden ohne dass die Tropfengröße verändert werden muss. Eine hohe Substratkonzentration kann erreicht werden, ohne dass eine Koaleszenz der Tropfen auftritt. Die geringe Oberflächenspannung erhöht die Transferrate der Moleküle an der Öl/Wasser Grenzfläche. Die hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität der PIT-Emulsionen ermöglicht biochemische Studien an Enzymen und deren Reaktivität sowie die Möglichkeit bereits bekannte Reaktionsbedingungen und Aktivitäten für Enzyme noch weiter zu optimieren.

Die PIT-Emulsionen enthalten, neben Wasser noch eine **Ölphase**, die Verbindungen aus der Gruppe der Fettsäurealkylester a) oder der nativen pflanzlichen Öle und deren Derivate b) enthält. Es handelt sich bei den Gruppen a) und b) um hydrophobe, in Wasser nicht oder nur sehr gering lösliche Verbindungen, die bevorzugt die Ausgangsstoffe, also Substrate für die durch enzymatische Katalyse gewünschten Produkte darstellen können aber auch als Hilfsstoffe eingesetzt werden können.

Geeignete Ester der Gruppe a) leiten sich insbesondere ab von gesättigten, ungesättigten, linearen oder verzweigten Fettsäuren mit insgesamt 7 bis 23 Kohlenstoffatomen. Es handelt sich also um Verbindungen der Formel (I)



wobei R1 für einen Alkylrest mit 6 bis 22 C-Atomen steht und R2 ein Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen ist, wobei Methyl- und Ethylreste besonders bevorzugt sind. Am vorteilhaftesten ist der Einsatz von Methylestern. Die Methylester der Formel (I) können auf übliche Weise, z.B. durch Umesterung von Triglyceriden mit Methanol und anschließender Destillation, erhalten werden. Geeignete Fettsäuren sind die Capron-, Heptan-, Capryl-, Perlagon-, Caprin-, Undecan-, Laurin-, Tridecan-, Myristin-, Pentadecan-, Palmitin-, Heptadecan-, Stearin-, Nonadecan-, Arachin- und Behensäure. Ungesättigte Vertreter sind beispielsweise Laurolein-, Myristolein-, Palmitolein-, Petroselaidin-, Öl-, Elaidin-, Ricinol-, Linol-, konjugierte Linolsäure (CLA), insbesondere die cis9,trans11-CLA oder die trans10,cis12-CLA, Linolaidin-, Linolen-, konjugierte Linolsäure Gadolein-, Arachidon und Erucasäure. Auch Mischungen der Methyl-

ester und/oder Ethylester dieser Säuren sind geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung solcher PIT-Emulsionen, die Methylester und/oder Ethylester aus der Gruppe Methyloleat, Methylpamat, Methylstearat, Methylpelargonat, Ethyloleat, Ethylpamat, Ethylstearat und/oder Ethylpelargonat enthalten. Es können aber auch Methylester und/oder Ethylester auf Basis natürlicher Fettsäuremischungen eingesetzt werden, wie sie beispielsweise aus Lein-, Kokos-, Palm-, Palmkern-, Oliven-, Ricinus-, Rüb-, Soja- oder Sonnenblumenölen (bei Raps- und Sonnenblumenöl jeweils neue und alte Züchtungen) erhalten werden.

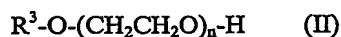
Geeignete Verbindungen der Gruppe b) sind native Öle pflanzlichen Ursprungs. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um Triglyceride und Triglyceridmischungen, wobei das Glycerin mit längerkettigen Fettsäuren jeweils vollständig verestert ist. Besonders geeignete pflanzliche Öle sind ausgewählt aus der Gruppe Erdnuß-, Kokos- und/oder Sonnenblumenöl.

Wichtige Bestandteile der erfindungsgemäß verwendeten PIT-Emulsionen sind die eingesetzten **Emulgatoren** bzw. Emulgatorsysteme. Vorzugsweise werden als Emulgatoren nichtionische Emulgatoren, insbesondere ethoxylierte Fettalkohole und Fettsäuren eingesetzt. Zur Ausbildung von PIT-Emulsionen ist es vorteilhaft ein zweikomponentiges Emulgatorsystem, enthaltend einen hydrophilen Emulgator (A) und einen hydrophoben Coemulgator (B) einzusetzen. Als hydrophile nichtionische Emulgatoren (A) eignen sich Stoffe, die einen HLB-Wert von etwa 8 bis 18 aufweisen. Unter dem HLB-Wert (Hydrophil-Lipophil-Balance) soll ein Wert verstanden werden, der gemäß

$$\text{HLB} = (100 - L) / 5$$

errechnet werden kann, wobei L der Gewichtsanteil der lipophilen Gruppen, d.h. der Fettalkyl- oder Fettacylgruppen in Prozent in den Ethenoxidanlagerungsprodukten ist.

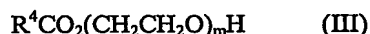
Fettalkoholethoxylate im Sinne der erfindungsgemäßen Lehre folgen der allgemeinen Formel (II)



wobei R^3 für einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten Alkylrest mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen steht und n eine Zahl von 1 bis 50 bedeutet. Besonders bevorzugt sind solche Verbindungen der Formel (II), in der n für eine Zahl von 1 bis 35 und insbesondere von 1 bis 15 steht. Besonders bevorzugt sind weiterhin solche Verbindungen der Formel (II), in der R^3 für einen Alkylrest mit 16 bis 22 Kohlenstoffatomen steht.

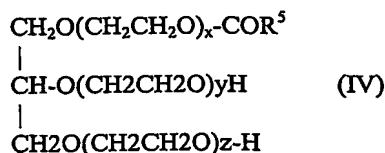
Die Verbindungen der Formel (II) werden in an sich bekannter Weise durch Umsetzung von Fettalkoholen mit Ethylenoxid unter Druck, ggf. in Gegenwart saurer oder basischer Katalysatoren erhalten. Typische Beispiele sind Capronalkohol, Caprylalkohol, 2-Ethylhexylalkohol, Caprinalkohol, Laurylalkohol, Isotridecylalkohol, Myristylalkohol, Cetylalkohol, Palmoleylalkohol, Stearylalkohol, Isostearylalkohol, Oleylalkohol, Elaidylalkohol, Petroselinylalkohol, Linolylalkohol, Linolenylalkohol, Elaeostearylalkohol, Arachylalkohol, Gadoleylalkohol, Behenylalkohol, Erucylalkohol und Brassidylalkohol sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Hochdruckhydrierung von technischen Methylestern auf Basis von Fetten und Ölen oder Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese sowie als Monomerfraktion bei der Dimerisierung von ungesättigten Fettalkoholen anfallen. Bevorzugt sind technische Fettalkohole mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Kokos-, Palm-, Palmkern- oder Talgfettalkohol.

Fettsäureethoxylate, die ebenfalls als Emulgatorkomponente (A) in Betracht kommen, folgen vorzugsweise der Formel (III),



in der R^4 für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und m für Zahlen von 5 bis 50 und vorzugsweise 12 bis 35 steht. Typische Beispiele sind Anlagerungsprodukte von 10 bis 30 Mol Ethylenoxid an Laurinsäure, Isotridecansäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmoleinsäure, Stearinsäure, Isostearinsäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Petroselinsäure, Linolsäure, Linolensäure, Elaeostearinsäure, Arachinsäure, Gadoleinsäure, Behensäure und Erucasäure sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Druckspaltung von natürlichen Fetten und Ölen oder bei der Reduktion von Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese anfallen. Vorzugsweise werden Anlagerungsprodukte von 10 bis 30 Mol Ethylenoxid an Fettsäuren mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen eingesetzt.

Partialglyceride, die als Emulgatorkomponente (B) in Betracht kommen, folgen vorzugsweise der Formel (IV),



in der COR^5 für einen linearen oder verzweigten Acylrest mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und x , y und z in Summe für 0 oder für Zahlen von 1 bis 50, vorzugsweise 15 bis 35 steht. Typische Beispiele für im Sinne der Erfindung geeignete Partialglyceride sind Laurin-

säuremonoglycerid, Kokosfettsäuremonoglycerid, Palmitinsäuremonoglycerid, Stearinsäuremonoglycerid, Isostearinsäuremonoglycerid, Ölsäuremonoglycerid, konjugierte Linolsäuremonoglyceride und Talgfettsäuremonoglycerid sowie deren Addukte mit 5 bis 50 und vorzugsweise 20 bis 30 Mol Ethylenoxid. Vorzugsweise werden Monoglyceride bzw. technische Mono/Diglyceridgemische mit überwiegendem Monoglyceridanteil der Formel (IV) eingesetzt, in der COR⁵ für einen linearen Acylrest mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen steht.

Üblicherweise werden Emulgatormischungen eingesetzt, die die Komponenten (A) und (B) im Gewichtsverhältnis 10 : 90 bis 90 : 10, vorzugsweise 25 : 75 bis 75 : 25 und insbesondere 40 : 60 bis 60 : 40 enthalten.

Als weitere geeignete Emulgatoren kommen beispielsweise nichtionogene Tenside aus einer der folgenden Gruppen in Frage:

- Anlagerungsprodukte von 2 bis 30 Mol Ethylenoxid vorzugsweise 4 bis 10 Mol Ethylenoxid und/ oder 0 bis 5 Mol Propylenoxid an lineare Fettalkohole mit 8 bis 22 C-Atomen;
- Glycerinmono- und -diester und Sorbitanmono- und -diester von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen und deren Ethylenoxidanlagerungsprodukte mit 1 bis 30 Mol Ethylenoxid;
- Alkylmono- und -oligoglycoside mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen im Alkylrest und deren ethoxylierte Analoga;
- Anlagerungsprodukte von 15 bis 60 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;
- Polyol- und insbesondere Polyglycerinester wie z.B. Polyglycerinpolyricinoleat oder Polyglycerinpoly-12-hydroxystearat. Ebenfalls geeignet sind Gemische von Verbindungen aus mehreren dieser Substanzklassen;
- Anlagerungsprodukte von 2 bis 15 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;
- Partialester auf Basis linearer, verzweigter, ungesättigter bzw. gesättigter C_{12/22}-Fettsäuren, Ricinolsäure sowie 12-Hydroxystearinsäure und Glycerin, Polyglycerin, Pentaerythrit, Dipentaerythrit, Zuckeralkohole (z.B. Sorbit) sowie Polyglucoside (z.B. Cellulose);
- Wollwachsalkohole;
- Polyalkylenglycole.

Die Anlagerungsprodukte von Ethylenoxid und/oder von Propylenoxid an Glycerinmono- und -diester sowie Sorbitanmono- und -diester von Fettsäuren oder an Ricinusöl stellen bekannte,

im Handel erhältliche Produkte dar. Es handelt sich dabei um Homologengemische, deren mittlerer Alkoxylierungsgrad dem Verhältnis der Stoffmengen von Ethylenoxid und/oder Propylenoxid und Substrat, mit denen die Anlagerungsreaktion durchgeführt wird, entspricht.

- 5 Zur Auswahl geeigneter Emulgatorsysteme kann es zweckmäßig sein, rechnerisch die Ermittlung der PIT des jeweiligen Systems durchzuführen. Insbesondere gilt das aber auch für potentielle Optimierungen in der Auswahl der Emulgatoren beziehungsweise Emulgatorsysteme und ihrer Anpassung an die durch sonstige Überlegungen zum technischen Handeln vorgegebene Auswahl und Abmischung von wäßriger Phase einerseits und Typ der Ölphase andererseits.
- 10 Entsprechendes Fachwissen ist aus an sich ganz anderen Bereichen, insbesondere aus dem Bereich der Kosmetika-Herstellung, entwickelt worden. Verwiesen wird insbesondere auf die Veröffentlichung TH.Förster, W.von Rybinski, H.Tesmann und A.Wadle "*Calculation of optimum emulsifier mixtures for phase inversion emulsification*", in International Journal of Cosmetic Science 16, 84-92 (1994). Dargestellt ist hier im einzelnen wie auf rechnerischem
- 15 Weg für vorgegebene 3-Komponenten-Systeme aus einer Ölphase, einer Wasserphase und einem Emulgator auf der Basis des für die Ölphase charakteristischen EACN-Wertes (equivalent alkane carbon number) der Temperaturbereich der Phaseninversion (PIT) über die CAPICO-Methode (calculation of phase inversion in concentrates) errechnet werden kann. Diese Veröffentlichung Förster et al. bezieht insbesondere wiederum wesentliche Literatur für
- 20 den hier angeschnittenen Themenkomplex ein, die im Zusammenhang mit der Offenbarung dieser Veröffentlichung Förster et al. zu sehen ist. Im einzelnen wird dann anhand zahlreicher Beispiele dargestellt, wie mittels der CAPICO-Methode im Rahmen des EACN-Konzepts die Auswahl und Optimierung der Emulgatoren/Emulgatorsysteme zur optimalen Einstellung vorgegebener Werte für den Temperaturbereich der Phaseninversion zugänglich wird.

25

- Die erfindungsgemäß verwendeten PIT-Emulsionen enthalten vorzugsweise von 20 bis 90 Gew.-% Wasser, insbesondere von 30 bis 80 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt von 30 bis 60 Gew.-%. Der Rest auf 100 Gew.-% entfällt auf die Ölphase sowie Emulgatoren und ggf. weitere Hilfs- und Zusatzstoffe. Die Ölphase selbst ist vorzugsweise in Mengen von 10
- 30 bis 80 Gew.-%, insbesondere von 40 bis 70 Gew.-% enthalten. Dabei enthält die Ölphase vorzugsweise ausschließlich die Komponenten a) oder b) bzw. Mischungen dieser Komponenten. Die Emulgatoren, bzw. Emulgatorsysteme sind vorzugsweise in Mengen von 1 bis 25 Gew.-%, insbesondere in Mengen von 5 bis 20 und besonders bevorzugt in Mengen von 5

bis 15 Gew.-% enthalten. Die erfindungsgemäß verwendeten Emulsionen weisen vorzugsweise Phaseninversionstemperaturen im Bereich von 20 bis 95 °C und insbesondere von 30 bis 95 °C auf.

5 Die erfindungsgemäß verwendeten **Enzyme** stellen Enzyme dar, die grenzflächenaktiv sind. Vorzugsweise werden Enzyme aus der Gruppe der Hydrolasen und/oder Acyltransferasen eingesetzt die entweder allein oder in Kombination mit mehreren Enzymen eingesetzt werden können.

10 Besonders bevorzugt sind Hydrolasen ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Esterasen, Phospholipasen, Lipasen und Lipasen/Acyltransferasen. Bei letzten handelt es sich um Enzyme, die grenzflächenaktiv sind und Reaktionen katalysieren, die charakteristisch für Lipasen sind. Es wurde gefunden, dass diese Polypeptide in der Lage sind, Transesterifizierungen in Gegenwart kurzkettiger Alkohole zu katalysieren bei einem Wassergehalt im Reaktionsgemisch, der einer Wasser-Aktivität größer 0,8 entspricht. Bei diesem Gehalt an Wasser
15 würde eine herkömmliche Lipase in Abhängigkeit von der Alkoholkomponente überwiegend die Hydrolyse der Ester katalysieren. Es handelt sich also um Enzyme, welche sowohl charakteristische Merkmale für Lipasen als auch für Acyltransferasen zeigen. Bei dem erfindungsgemäßen, natürlich vorkommendem Enzym handelt es sich aufgrund von Sequenzhomologien zu bislang bekannten Enzymen wie beispielsweise Lipase aus *Candida parapsilosis* um eine
20 Lipase und aufgrund seiner enzymatischen Aktivität um eine Acyltransferase.

Typische Beispiele für geeignete Enzyme, die jedoch nicht einschränkend sein sollen, sind Lipasen und/oder Lipasen/Acyltransferasen von Organismen die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von *Alcaligenes*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aeromonas aerophila*, *Bacillus species*, *Candida albicans*, *Candida antarctica* (*Trychosporon oryzae*, *Pseudozyma antarctica*), *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Chromobacterium viscosum*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*), *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*, *C. pseudotropicalis*), *Mucor javanicus*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), *Porcine pancreas*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus javanicus* und *Thermomyces lanuginosus* sowie deren Gemischen. Bevorzugt, weil besonders aktiv, sind Lipasen und Lipasen/Acyltransferasen aus den Organismen *Alcaligenes*, *Candida*, *Chromobacterium*, *Rhizomucor*, *Pseudomonas*, *Rhizopus* und *Thermomyces* insbesondere um Enzyme aus *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*) oder *Candida antarctica*.
30
35

Die erfindungsgemäß einzusetzenden Enzyme können in unterschiedlichen Formen eingesetzt werden. Prinzipiell sind alle dem Fachmann gebräuchlichen Darreichungsformen von Enzy-

men anwendbar. Unter die Definition „Enzym“ fallen erfindungsgemäß auch die Begriffe Protein und Enzym-Protein. Erfindungsgemäß ist sowohl das Enzymprotein als auch das Gesamtprotein welches in einem Teil der Proteinsequenz die Funktion des erfindungsgemäßen Proteins beinhaltet anzuwenden. Vorzugsweise werden die Enzyme in reiner Form oder als technisches Enzympräparat entweder immobilisiert auf Trägermaterial und/oder in Lösung, insbesondere in wässriger Lösung eingesetzt und in sogenannten "repeated batches" wiederverwendet. Ebenfalls bevorzugt sind kristallisierte Enzyme, sogenannte CLEC's, beispielsweise zu beziehen von der Firma Altus. Der Anteil an aktiven Enzym in den jeweiligen technischen Enzympräparaten variiert von Hersteller zu Hersteller. Der Anteil liegt jedoch im Mittel zwischen 1 und 10 % aktiven Enzym.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden Enzyme werden in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung eingesetzt in einer Menge von 0,001 bis 20 Gew.-% berechnet als reines Enzym oder als Enzympräparat, bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetzter Ölphase. Im Besonderen liegt die einzusetzende Menge bei 0,002 bis 1 Gew.-% und besonders bevorzugt bei 0,002 bis 0,2 Gew.-%.

Im Sinne der Erfindung handelt es sich bei den enzymatisch katalysierten Reaktionen bevorzugt um Hydrolysen, Umesterungen oder Veresterungen, wobei die Umesterungen besonders bevorzugt sind.

Im Sinne der Erfindung werden durch die enzymatisch katalysierten Reaktionen unter Verwendung der erfindungsgemäßen PIT-Emulsion kosmetische und/oder pharmazeutische Produkte und/oder Feinchemikalien hergestellt. Im besonderen werden Carotinoide, sterolhaltige Ölkomponenten und/oder Vitamin E hergestellt.

Die erfindungsgemäßen O/W-Emulsionen, enthaltend mindesten Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase und hergestellt nach dem PIT-Verfahren eignen sich hervorragend für die Verwendung als Reaktionsmedium für enzymatisch katalysierte Reaktionen. Hieraus lässt sich direkt ein weiterer Gegenstand der Erfindung ableiten. Es handelt sich um ein Verfahren zur enzymatisch katalysierten Hydrolyse, Umesterung oder Veresterung von Fettsäurealkylestern und/oder Triglyceriden, bei dem O/W-Emulsionen als Reaktionsmedium eingesetzt werden, die nach dem PIT-Verfahren hergestellt werden. Die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten Emulsionen entsprechen in ihren Bestandteilen, Bedingungen und näheren Ausführungsformen den Emulsionen, die bereits für die Verwendung dieser O/W-Emulsionen näher beschrieben wurden. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugt kosmetische und/oder pharmazeutische Produkte und/oder Feinchemikalien hergestellt. Im besonderen werden Carotinoide, sterolhaltige Ölkomponenten und/oder Vitamin E hergestellt.

Bei diesem Verfahren kann man es sich zu nutze mache, dass die nicht wasserlöslichen Substrate, in der Ölphase der PIT-Emulsion löslich werden und so der enzymatisch katalysierten Reaktion zugänglich sind.

5 Die PIT-Emulsionen enthaltend das Substrat werden erfindungsgemäß dem Reaktionsgefäß welches die Lipase bzw. Lipase/Acyltransferase immobilisiert oder nicht immobilisiert sowie ggf. weitere Hilfs- und Zusatzstoffe enthält, zudosiert. Die Einzelheiten dieses Verfahrens, insbesondere die Menge an Enzym und der zudosierten Emulsion, ergeben sich aus der Art der Enzyme und der gewählten PIT-Emulsion und können vom Fachmann an die spezifischen Gegebenheiten angepasst werden. Durch Erhitzen des Systems kann eine Phasentrennung erreicht werden und der Emulgator in der wässrigen Phase und das Produkt in der Ölphase in einfacher Weise voneinander getrennt werden. Durch die Verwendung von Festbettreaktoren enthaltend das Enzym ist eine Abtrennung und Wiederverwendung des Enzyms gegeben.

15 Die Feinteiligkeit der Öltröpfchen führt zu einer großen Oberfläche zwischen Öl- und Wasserphase und ermöglicht so einen schnellen Kontakt und eine erhöhte Reaktionsrate zwischen den Enzymen und der die Substrate enthaltenden Ölphase.

In einer besonderen Ausführungsform dieses Verfahrens werden Enzyme eingesetzt, die bereits für die Verwendung der erfindungsgemäßen O/W-Emulsion aufgelistet wurden.

20 Die erfindungsgemäßen Reaktionsbedingungen der enzymatisch katalysierten Reaktion richten sich nach dem optimalen Reaktionsbereich der ausgewählten Enzyme und nach den verwendeten Emulsionen. Im Besonderen handelt es sich um Bedingungen bei denen unter anderem die Reaktionstemperatur zwischen 15 und 50 °C, bevorzugt eine Temperatur zwischen 20 und 40 °C, insbesondere eine Temperatur von 35 °C gewählt wird.

Beispiele

5

Herstellbeispiel H1

Umesterung von Ölsäureethylester mit Methanol oder Hydrolyse von Ölsäureethylester durch Lipase/Acyltransferase und Hydrolyse des eingesetzten Ölsäureesters.

- 10 Zur Herstellung der PIT-Emulsion von C18:1 Ölsäureethylester wurde eine Mischung aus 0,25 g Polyoxyethylen-12-Cetylstearylalkohol (Eumulgin® B1) und 0,2 g Polyoxyethylen-6-Cetylalkohol mit 1 g Ölsäureethylester und 3 g ultrareinem Wasser unter Rühren bis auf 95 °C aufgeheizt, bis alle Komponenten geschmolzen waren. Anschließend wurde unter Rühren bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Phaseninversionstemperatur (PIT) lag bei ungefähr 66 °C.
- 15 Diese Emulsion (10 µmol/ml) wurde zu einer auf pH 6,5 gepufferten Lösung enthaltend Lipase/Acyltransferase (CPLIP2) und 2,2 mol/l Methanol als Substrat gegeben und die Hydrolyse bzw. die Methanolyse in µmol/min/ml in Abhängigkeit von der Enzymmenge [µg/ml] bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1:

Enzymmenge [µg/ml]	Hydrolyse [µmol/min/ml]	Methanolyse [µmol/min/ml]
1	0,001	0,005
2	0,003	0,009
5	0,015	0,025
10	0,038	0,050
15	0,088	0,066

Des weiteren wurde die Aktivität des Enzyms in der PIT-Emulsion mit Ölsäureethylester in Gegenwart von Methanol oder Isopropanol bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 2: Aktivität des Enzyms [14 µg/ml] bei 45 °C

Methanol [mol/l]	Hydrolyse [µmol/min/ml]	Methanolyse [µmol/min/ml]
0	0,089	0
0,5	0,037	0,024
1	0,024	0,034
2,2	0,009	0,074
4	0,002	0,128

25

Tabelle 3: Aktivität des Enzyms [35 µg/ml] bei 30 °C

Isopropanol [mol/l]	Hydrolyse [µmol/min/ml]	Isopropanolyse [µmol/min/ml]
0	0,042	0
0,1	0,043	0
0,2	0,031	0,009
0,5	0,032	0,017
1,0	0,027	0,046
1,25	0,023	0,066
1,5	0,022	0,11
1,75	0,020	0,17
2,0	0,009	0,19
2,25	0,009	0,20
2,5	0,0003	0,17
3,0	0	0,027

Diskussion der Ergebnisse:

5

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Umesterung der Methanolyse als auch die Hydrolyse durchführbar sind in einer PIT Emulsion und dass das Enzym die besonderen Fähigkeiten nicht verliert. Es zeigt sich weiterhin, dass eine Methanolyse in Gegenwart von Wasser der PIT-Emulsion gegenüber einer Hydrolyse bevorzugt ist.

- 10 Die Umesterung zu Isopropyloleat in dem genannten System ist ebenfalls durchführbar wobei die Aktivität des Enzyms bei 2,25 mol/l Isopropanol ein Maximum anzeigt.

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung von O/W-Emulsionen als Reaktionsmedium für enzymatisch katalysierte Reaktionen, enthaltend mindesten Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase, dadurch gekennzeichnet, dass die Emulsion nach dem PIT-Verfahren hergestellt wird und eine Tröpfchengröße von 50 bis 400 nm aufweist.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Ölphase Verbindungen enthält, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Fettsäurealkylester und Triglyceride.
3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Emulsionen verwendet werden, die Fettsäurealkylester der Formel (I) enthalten
- R1-COO-R2 (I)
- 15 wobei R1 für einen Alkylrest mit 6 bis 22 C-Atomen steht und R2 einen Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen bedeutet.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass Emulsionen verwendet werden, die die Ölphase in Mengen von 10 bis 80 Gew.-%, vorzugsweise 20 bis 50 Gew.-% enthalten.
- 20 5. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass Emulsionen verwendet werden, die Wasser in Mengen von 20 bis 90 Gew.-%, vorzugsweise von 30 bis 80 Gew.-% und insbesondere von 30 bis 70 Gew.-% enthalten.
6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass Emulsionen verwendet werden, die ein Emulgatorsystem, enthaltend hydrophile Emulgatoren mit HLB-Werten von 8 bis 18 in Kombination mit hydrophoben Coemulgatoren enthalten.
- 25 7. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass Emulsionen verwendet werden, deren Emulgatorsysteme Mengenverhältnisse zwischen hydrophilen Emulgatoren und Coemulgatoren von 10 : 90 bis 90 : 10 aufweisen.
- 30 8. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass Emulsionen verwendet werden, die Emulgatoren in Mengen von 1 bis 25 Gew.-%, vorzugsweise in Mengen von 5 bis 20 Gew.-% und insbesondere in Mengen von 5 bis 15 Gew.-% enthalten.

9. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Enzymen um grenzflächenaktive Enzyme handelt, insbesondere um Hydrolasen und/oder Acyltransferasen.
- 5 10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolasen ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Esterasen, Phospholipasen, Lipasen, und Lipasen/Acyltransferasen.
- 10 11. Verwendung nach den Ansprüchen 9 und 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolasen ausgewählt sind aus den Lipasen und/oder Lipasen/Acyltransferasen erhältlich aus Organismen, aus der Gruppe *Alcaligenes*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aeromonas aerophila*, *Bacillus species*, *Candida albicans*, *Candida antarctica* (*Trychosporon oryzae*, *Pseudozyma antarctica*), *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida glabrata*, *Candida maltosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Chromobacterium viscosum*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*), *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*, *C. pseudotropicalis*), *Mucor javanicus*, *Penicilium camemberti*, *Penicilium roqueforti*, *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), *Porcine pancreas*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus javanicus* und *Thermomyces lanuginosus* sowie deren Gemische.
- 15 12. Verwendung nach den Ansprüchen 9 bis 11 dadurch gekennzeichnet, dass das oder die Enzyme eingesetzt werden in einer Menge von 0,001 bis 20 Gew.-% berechnet als reines Enzym oder als Enzympräparat, bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetzter Ölphase.
- 20 13. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den enzymatisch katalysierten Reaktionen um Hydrolyse, Veresterung oder Umesterung handelt.
- 25 14. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass bei der enzymatisch katalysierten Reaktion kosmetische und/oder pharmazeutische Produkte und/oder Feinchemikalien hergestellt werden.
- 30 15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den kosmetischen und/oder pharmazeutischen Produkten und/oder den Feinchemikalien um Carotinoide, sterolhaltige Ölkomponenten und/oder Vitamin E handelt.
16. Verfahren zur enzymatisch katalysierten Veresterung, Umesterung oder Hydrolyse von Fettsäurealkylestern und/oder Triglyceriden dadurch gekennzeichnet, dass O/W-Emulsionen als Reaktionsmedium eingesetzt werden nach Anspruch 1 bis 8.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass bei der enzymatisch katalysierten Reaktion kosmetische und/oder pharmazeutische Produkte und/oder Feinchemikalien hergestellt werden.
- 5 18. Verfahren nach Anspruch 16 und/oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den kosmetischen und/oder pharmazeutischen Produkten und/oder den Feinchemikalien um Carotinoide, sterolhaltige Ölkomponenten und/oder Vitamin E handelt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass Enzyme nach Anspruch 9 bis 12 eingesetzt werden.

Zusammenfassung

5 Vorgeschlagen wird die Verwendung von O/W-Emulsionen als Reaktionsmedium für enzymatisch katalysierte Reaktionen, enthaltend mindesten Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase, dadurch gekennzeichnet, dass die Emulsion nach dem PIT-Verfahren hergestellt wird und eine Tröpfchengröße von 50 bis 400 nm aufweist. Bei den eingesetzten Enzymen handelt es sich um grenzflächenaktive Enzyme, insbesondere um Hydrolasen und/oder Acyltransferasen.

10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.